

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
11 avril 2002 (11.04.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/28521 A1

- (51) Classification internationale des brevets⁷ : **B01J 13/00**, **A61K 9/51**
- (74) Mandataires : **CABINET PLASSERAUD** etc.; 84 rue d'Amsterdam, F-75440 Paris Cedex 09 (FR).
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/03083
- (81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) Date de dépôt international : 5 octobre 2001 (05.10.2001)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
00/12837 6 octobre 2000 (06.10.2000) FR
- (84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) :
FLAMEL TECHNOLOGIES [FR/FR]; 33 Avenue du Docteur Georges Lévy, F-69693 Vénissieux Cedex (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **BRYSON**, Nathan [FR/FR]; 120 rue du Coteau, F-69390 Millery (FR). **SOULA**, Gérard [FR/FR]; 33 rue Nungesser, F-69330 Meyzieu (FR).
- Publiée :
— avec rapport de recherche internationale
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: COLLOIDAL SUSPENSION OF SUBMICRONIC PARTICLES FOR CARRYING ACTIVE PRINCIPLES AND THEIR MODE OF PREPARATION

(54) Titre : SUSPENSION COLLOÏDALE DE PARTICULES SUBMICRONIQUES DE VECTORISATION DE PRINCIPES ACTIFS ET LEUR MODE DE PREPARATION

(57) Abstract: The invention concerns a suspension of biocompatible particles for carrying active principles. Said carrier particles are based on a double-block hydrophilic neutral polyaminoacid/ hydrophobic neutral polyaminoacid copolymer. Said hydrophilic neutral polyaminoacid/ hydrophobic neutral polyaminoacid particles are capable of combining in colloidal suspension in non-dissolved state, at least an active principle and of releasing same, in particular in vivo, in prolonged and/or delayed delivery. The invention also concerns a powdery solid from which are derived the carrier particles and the preparation of said solid and of said suspension of active principle based on hydrophilic neutral polyaminoacids/ hydrophobic neutral polyaminoacids. Said carrier particles form spontaneously and in the absence of surfactants or organic solvents, stable aqueous suspensions. The invention also concerns the carrier particles in dry form, the method for preparing them, and pharmaceutical compositions (in dry form or suspension) comprising said carrier particles associated with an active principle.

(57) Abrégé : L'invention concerne une suspension de particules biocompatibles de vectorisation (PV) de principes actifs (PA). Ces PV sont à base d'un copolymère dibloc polyaminoacide neutre hydrophile (polyAANI) / polyaminoacide neutre hydrophobe (polyAANO). Ces particules de polyAANI/polyAANO sont aptes à associer en suspension colloïdale à l'état non dissous, au moins un PA et à libérer celui-ci, notamment in vivo, de manière prolongée et/ou retardée. L'invention vise, également, un solide pulvérulent à partir duquel sont issues les PV ainsi que la préparation de ce solide et de cette suspension de PV à base de polyAANI/polyAANO. Ces nouvelles PV forment spontanément et sans l'aide de tensioactifs ou de solvants organiques, des suspensions aqueuses stables. L'invention concerne également les PV sous forme sèche, leur procédé de préparation, ainsi que des compositions pharmaceutiques (forme sèche ou suspension) comprenant ces PV associés à un principe actif.

WO 02/28521 A1

SUSPENSION COLLOIDALE DE PARTICULES SUBMICRONIQUES DE
VECTORISATION DE PRINCIPES ACTIFS ET LEUR MODE DE PRÉPARATION

DOMAINE TECHNIQUE

5 Le domaine de la présente invention est celui des Particules de Vectorisation (PV), utiles pour l'administration de principes actifs (PA). Ces derniers sont, de préférence, des médicaments ou des nutriments pour l'administration à un organisme animal ou humain par voie orale ou nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, 10 intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale, parentérale, etc... Mais il peut s'agir aussi de produits cosmétiques ou de produits phytosanitaires, tels que des herbicides, des pesticides, des insecticides, des fongicides, etc. En terme de nature chimique, les PA plus particulièrement, mais 15 non limitativement, concernés par l'invention sont, par exemple, des protéines, des glycoprotéines, des peptides, des polysaccharides, des lipopolysaccharides, des oligonucléotides, des polynucléides et des molécules organiques.

La présente invention concerne, plus précisément, des suspensions 20 colloïdales de Particules de Vectorisation, avantageusement de type submicronique, à base de polyaminoacides (PAA).

La présente invention vise aussi bien des particules nues en tant que telles, que les systèmes de vecteurs de PA, constitués par les particules chargées par le (ou les) PA considéré(s).

25 La présente invention a également trait à des solides pulvérulents comprenant ces PV.

L'invention concerne, également, des procédés de préparation desdites suspensions colloïdales de particules, avec ou sans PA.

30 ART ANTERIEUR

L'encapsulation ou l'adsorption de PA dans les PV a notamment, pour but de modifier leur durée d'action et/ou de les acheminer au lieu du traitement et/ou augmenter la biodisponibilité desdits PA. De nombreuses techniques d'encapsulation ont déjà été proposées.

35 De telles techniques visent, d'une part, à permettre le transport du PA jusqu'à son site d'action thérapeutique, tout en le protégeant contre les agressions de l'organisme (hydrolyse,

digestion enzymatique, etc.) et, d'autre part, à contrôler la libération du PA sur son site d'action, afin de maintenir la quantité disponible pour l'organisme au niveau désiré. Les PA concernés par ces avatars de transport et de séjour dans l'organisme sont, par exemple, des protéines mais peuvent être, également, des produits tout autres, des molécules organiques d'origine synthétique ou naturelle. La revue de M.J. HUMPHREY (Delivery system for peptide Drugs, éditée par S. DAVIS et L. ILLUM, Plenum Press, N.Y. 1986), fait état de la problématique concernant l'amélioration de la biodisponibilité des PA et l'intérêt des systèmes de vectorisation et de libération contrôlée.

Les PV selon l'invention sont du type de celles sur lesquelles le PA est adsorbé.

Parmi tous les matériaux envisageables pour former des PV, les polymères sont de plus en plus utilisés, du fait de leurs propriétés intrinsèques. S'agissant du cahier des charges que l'on souhaite obtenir pour les PV, il est particulièrement exigeant et comprend, notamment, les spécifications suivantes.

- 1 La première spécification recherchée pour les PV serait que le polymère, constituant les PV soit biocompatible, éliminable (par excrétion) et/ou biodégradable et, encore mieux, qu'il soit métabolisé en produits non toxiques pour l'organisme. En outre, il conviendrait que la biodégradation dans l'organisme soit d'une durée suffisamment courte.
- 2 Les PV auraient avantage à pouvoir former, sans l'aide de solvant organique et/ou de tensioactif, une suspension aqueuse stable.
- 3 Il serait également souhaitable que les PV aient une taille suffisamment faible pour pouvoir subir, en suspension dans un liquide, une filtration stérilisante par un filtre dont le diamètre des pores est inférieur ou égal à 0,2 μm .

- 4 Il est souhaitable que les PV et les systèmes PV-PA
puissent être obtenus par un procédé non dénaturant pour
le PA.
- 5 Les PV devraient, avantageusement, permettre de
contrôler la vitesse de libération du PA.
- 6 Une autre spécification importante serait que les
systèmes PV-PA puissent constituer d'excellents
médicaments injectables. Cette aptitude améliorée de
l'administration par injection -e.g. intraveineuse ou
10 intramusculaire- « injectabilité » se caractérise par :
- (i) un volume injecté réduit (pour une dose
thérapeutique donnée)
 - (ii) une viscosité faible.
- Ces deux propriétés sont satisfaites lorsque la dose
15 thérapeutique de PA est associée à une quantité minimale
de PV. En d'autres termes, les PV doivent avoir un fort
taux de chargement en PA.
- 7 Le coût propre aux PV dans une préparation injectable
doit être réduit et là encore il convient que les PV
20 aient un fort taux de chargement en PA. En définitive,
la faible taille et un fort taux de chargement sont des
spécifications majeures recherchées pour les PV.
- 8 Il est également avantageux que le polymère, constitutif
des PV, n'induisse pas de réponse immunitaire.

25

Les propositions techniques antérieures, décrites infra, ont tenté
de satisfaire l'ensemble de ces spécifications. A titre
d'illustration, on citera les propositions antérieures (a) à (h) :

- (a) Le brevet US-A-5 286 495 concerne un procédé d'encapsulation
30 par vaporisation de protéines en phase aqueuse, à l'aide de
matériaux ayant des charges opposées, à savoir : l'alginate
(chargé négativement) et la polylysine (chargée
positivement). Ce procédé de fabrication permet de produire
des particules de taille supérieure à 35 μ m.
- 35 (b) Par ailleurs, les techniques d'émulsion sont couramment
utilisées pour préparer des microparticules chargées de PA.
Par exemple, les demandes de brevets WO 91/06286, WO 91/06287

et WO 89/08449 divulguent de telles techniques d'émulsion dans lesquelles on a recours à des solvants organiques pour solubiliser des polymères, par exemple de type polylactique. Mais il s'est avéré que les solvants peuvent être
5 dénaturants, notamment pour les PA peptidiques ou polypeptidiques.

(c) On connaît, également, des PV biocompatibles appelées protéinoïdes, décrites dès 1970 par X. FOX et K. DOSE dans « Molecular Evolution and the origin of Life », Ed. Marcel
10 DEKKER Inc (1977). Ainsi, la demande de brevet WO 88/01213 propose un système à base d'un mélange de polypeptides synthétiques, dont la solubilité dépend du pH. Pour obtenir les microparticules matricielles selon cette invention, ils solubilisent le mélange de polypeptides, puis avec un
15 changement de pH, ils provoquent la précipitation de particules protéinoïdes. Lorsque la précipitation s'effectue en présence d'un PA, celui-ci est encapsulé dans la particule.

(d) On mentionnera également, pour mémoire, le brevet US
20 4 351 337 qui relève d'un domaine différent de celui de la vectorisation de PA propre à l'invention. Ce brevet divulgue des implants massiques fixés et localisés à des endroits bien précis de l'organisme. Ces implants sont des tubes ou des capsules creuses de taille microscopiques (160 μ m et de
25 longueur égale à 2 000 μ m), constitués de copolymères de copoly(aminoacides) -e.g. poly(acide glutamique-leucine) ou poly(benzylglutamate-leucine)- obtenus par copolymérisation de monomères de N-carboxyanhydrides d'aminoacides (NCA). L'inclusion d'un PA s'opère par une technique d'évaporation
30 de solvant d'un mélange de polymère et de PA. Le brevet US 4 450 150 appartient à la même famille que le brevet US 4 351 337 étudié ci-dessus et a essentiellement le même objet. Les PAA constitutifs sont des poly(acide glutamique-éthylglutamate).

35 (e) La demande EP 0 734 720 a pour objet des particules de polyaminoacides utiles pour la vectorisation de PA. Ces

particules ont une taille comprise entre 10 et 500 nm, de préférence entre 30 et 400 nm.

Les particules selon EP 0 734 720 se forment spontanément par mise en contact de PAA avec une solution aqueuse. Les PAA comprennent des monomères aminoacides neutres et hydrophobes AANO (Leu, Ile, Val, Ala, Pro, Phe) et des monomères ionisables et hydrophiles AAI (Glu, Asp). Ces PAA sont préparés par copolymérisation de NCA de précurseurs d'AAI (e.g. Glu-OMe) et de NCA d'AAO (e.g. Leu) en solution dans un mélange dioxane/toluène. Le copoly(Glu-OMe)(Leu) obtenu en solution est récupéré par précipitation dans l'eau, filtration et séchage. Ce copolymère est alors soumis à une hydrolyse acide en l'incorporant dans l'acide TriFluoroAcétique (TFA), dans lequel il se dissout. Un copolymère (Glu-O-Na)(Leu) est récupéré après neutralisation, dialyse, filtration et lyophilisation.

Le coPAA est dispersé dans une solution aqueuse de NaCl et il se forme spontanément une suspension de nanoparticules. Dès lors que l'on met en présence ces PV en suspension aqueuse avec un PA, celui-ci s'associe spontanément par adsorption avec les PV. Ces dernières présentent un cœur hydrophobe formé par des aminoacides hydrophobes et une "chevelure" extérieure hydrophile à base de d'aminoacides hydrophiles.

Il est à noter que les particules de vectorisation selon EP 0 734 720 comportent des aminoacides ionisables (Glu) porteurs d'une charge électrique stabilisatrice négative, qui permet de prévenir la floculation et l'agrégation des particules PV.

(f) Le FR-A-2 746 035 concerne des microparticules de gel composite, physico-chimiquement stables, intègres et susceptibles d'être utilisées comme vecteurs de principes actifs. Ces microparticules sont constituées d'huile (I), de phase aqueuse (II) et d'au moins un copolyaminoacide (III) linéaire, non réticulé, synthétique et comportant au moins deux types différents de comonomères aminoacides AAI hydrophiles et AAO hydrophobes. Les AAI peuvent être : Glu, Asp, Or, Arg, Lys, Asn, His et leurs associations. Les

comonomères AAO peuvent être : Leu, Tyr, Phé, Val, Cys, Ile et leurs associations. Le FR-A-2 746 035 décrit notamment page 27 lignes 8 à 18, une suspension colloïdale aqueuse de polyaminoacides, par exemple polyleucine/coglutamate de sodium.

Mais le FR-A-2 746 035 ne divulgue pas l'utilisation des copolymères seuls comme un système pharmaceutique nanoparticulaire de vectorisation de PA.

Les AAI du FR-A-2 746 035 ne sont pas des aminoacides hydrophiles neutres choisis dans le groupe comprenant :

- ✓ les acides aminés neutres naturels suivants : sérine, thréonine, hydroxyproline, glutamine ;
- ✓ les acides aminés neutres, rares ou synthétiques suivants : méthionine-Soxyde, O-glycosidyl-sérine ;
- ✓ les dérivés des acides aminés neutres : N-hydroxyéthyl-glutamine, N-hydroxypropyl-asparagine.

Toutes ces propositions techniques antérieures sus décrites :

- o soit satisfont incomplètement aux spécifications du cahier des charges indiqué supra, et, en particulier une aptitude à la stérilisation par filtration, une haute vitesse de dégradation, une adaptabilité aux contraintes de l'administration de médicaments par injection, un faible coût et un fort taux de chargement en PA ;
- o soit pourraient être remplacées par de nouvelles solutions techniques susceptibles de procurer de nouveaux avantages (référence antérieure EP 0 734 720).

BREF EXPOSE DE L'INVENTION

Dans cet état de fait, un objectif essentiel est de pouvoir fournir de nouvelles PV qui forment spontanément, et sans l'aide de tensioactifs ou de solvants organiques, des suspensions aqueuses stables de PV.

Un autre objectif essentiel de la présente invention est de fournir de nouvelles PV en suspension aqueuse colloïdale stable ou sous forme pulvérulente et à base de poly(aminoacides) (PAA), ces

nouvelles PV se devant de satisfaire au mieux aux spécifications 1 à 8 du cahier des charges susvisé.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de perfectionner les particules divulguées dans la demande PCT WO 96/29991.

- 5 Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir une suspension nouvelle de PV dont on maîtrise parfaitement les caractéristiques, notamment en termes du taux de chargement en PA et en termes de contrôle de cinétique de libération du PA.

- 10 Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir des suspensions médicamenteuses injectables. Les spécifications, requises pour de telles suspensions, sont un faible volume d'injection et une faible viscosité. Il importe que la masse de particules colloïdales par dose d'injection soit le plus faible possible et ce sans limiter la quantité du principe actif PA
15 transporté par ces particules, afin de ne pas nuire à l'efficacité thérapeutique.

- Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir une suspension colloïdale aqueuse ou un solide pulvérulent comprenant des particules de vectorisation de principes actifs satisfaisant
20 aux spécifications visées ci-dessus et qui constitue une forme galénique appropriée et convenable pour une administration, par exemple orale, à l'homme ou l'animal.

- Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir une suspension colloïdale comprenant des particules de vectorisation
25 de principes actifs filtrable sur des filtres de 0,2 μm à des fins de stérilisation.

- Un autre objectif essentiel de l'invention est de proposer un procédé de préparation de particules (sèches ou en suspension dans un liquide) de PAA utiles, notamment, comme vecteurs de principes
30 actifs, ledit procédé se devant d'être, plus simple à mettre en œuvre, non dénaturant pour les principes actifs et devant en outre toujours permettre une maîtrise fine de la granulométrie moyenne des particules obtenues.

- Un autre objectif essentiel de l'invention est l'utilisation des
35 susdites particules en suspension aqueuse ou sous forme solide pour la préparation :

- de médicaments (e.g. vaccins), en particulier pour administration notamment orale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou parentérale, les principes actifs de ces médicaments pouvant être, notamment, des protéines, des glycoprotéines, des peptides, des polysaccharides, des lipopolysaccharides, des oligonucléotides et des polynucléotides ;
- et/ou de nutriments ;
- et/ou de produits cosmétiques ou phytosanitaires ;
- et/ou de molécules organiques médicamenteuses.

Un autre objectif essentiel de la présente invention est de fournir des suspensions de PV submicroniques à base de PAA et susceptibles de servir de vecteur d'un PA, en particulier médicamenteux pour l'administration dudit PA à un organisme humain ou animal, ou bien encore d'un PA nutritionnel, phytosanitaire ou cosmétique.

Un autre objectif de la présente invention est de fournir un médicament, du type système à libération prolongée de principes actifs, qui soit aisé et économique à produire et qui soit, en outre, biocompatible et apte à assurer un très haut niveau de biodisponibilité du PA.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir un système de vectorisation de vaccin, qui soit non-immunogène intrinsèquement et en combinaison avec un ou plusieurs antigènes.

Les objectifs relatifs aux produits (parmi d'autres) sont atteints par la présente invention qui concerne, tout d'abord, une suspension colloïdale stable de particules structurées submicroniques susceptibles d'être utilisées, notamment pour la vectorisation de principe(s) actif(s) PA, ces particules étant des arrangements supramoléculaires individualisés (discrets) :

- o à base de polyaminoacides (PAA) amphiphiles, linéaires, à enchaînements peptidiques et comprenant au moins deux types différents d'acides aminés récurrents hydrophiles AAI et

hydrophobes AAO, les aminoacides de chaque type étant identiques ou différents entre eux ;

o aptes à associer en suspension colloïdale à l'état non dissous, au moins un PA et à libérer celui-ci, notamment in vivo, de manière prolongée et/ou retardée ;

o et stables en phase aqueuse à pH compris entre 4 et 13 en l'absence de tensioactif(s) ;

caractérisée en ce que

✓ en ce que les aminoacides récurrents hydrophiles AAI sont des aminoacides neutres hydrophiles AANI à l'exclusion de l'Asparagine;

✓ en ce que les aminoacides récurrents hydrophobes AAO sont des aminoacides neutres hydrophobes AANI ;

✓ et en ce que les acides aminés récurrents de chaque type AANI et AANO étant identiques ou différents entre eux.

EXPOSE DETAILLE DE L'INVENTION

L'un des fondements inventifs de ces nouvelles particules de vectorisation PV, en suspension aqueuse colloïdale stable ou à l'état de solide pulvérulent, tient à la sélection originale d'un groupe de polymères et d'une méthodologie originale permettant d'obtenir des particules de taille submicronique, qui forment une suspension colloïdale aqueuse stable en l'absence de tensioactifs ou de solvants.

Un autre fondement inventif de ces nouvelles particules de vectorisation PV, en suspension aqueuse colloïdale stable ou à l'état de solide pulvérulent, tient à la sélection originale de deux aminoacides neutres à titre de monomères récurrents hydrophiles AANI et hydrophobes AANO.

Or, contrairement à ce que l'homme du métier aurait pu craindre, le fait de ne pas avoir d'acides aminés hydrophiles ionisables AAPII et donc pas de charges négatives, comme dans les particules selon le WO 96/29991, n'a pas nuit à la stabilité. En effet, contre toute attente, la suspension colloïdale selon la présente invention ne flocule pas. Les particules à base de poly(AANI/AANO) ne s'auto-agrègent pas.

En outre, il n'était absolument pas évident a priori que ces particules de poly(AANI/AANO) puissent s'associer spontanément avec des principes actifs PA et relarguer ces PA sur les sites d'action thérapeutique.

5

La structure des polymères PAA et la nature des acides aminés neutres, sont choisies de telle façon que :

- les chaînes de polymères se structurent spontanément sous forme de particules (PV) de petite taille ;
- 10 • les particules forment une suspension colloïdale stable dans l'eau et en milieu physiologique ;
- les PV s'associent avec des protéines ou autres PA en milieu aqueux, par un mécanisme spontané et non dénaturant pour la protéine ;
- 15 • les PV libèrent les PA en milieu physiologique et, plus précisément, in vivo ; la cinétique de libération est fonction de la nature du polymère PAA précurseur des PV.

Ainsi, en jouant sur la structure particulière du PAA, on peut 20 contrôler les phénomènes d'association et de libération du PA sur le plan cinétique et quantitatif.

Il est du mérite de la demanderesse d'avoir choisi, à titre de matériau constitutif des PV, une composition particulière de polyaminoacides neutres qui sont amphiphiles et qui, donc, 25 possèdent des propriétés des PV en PAA, à savoir :

- possibilité de former spontanément des suspensions colloïdales de PV compatibles avec le pH des milieux physiologiques rencontrés dans les applications thérapeutiques visées ;
- 30 • association spontanée des PA avec des PV en l'absence d'autre agent que l'eau qui leur sert de solvant et qui, dans le cas des protéines, n'est pas dénaturant ;
- possibilité de libérer le PA du complexe d'association PA-PV, dans des conditions physiologiques, avec des 35 profils pharmacocinétique et pharmacodynamique, qui laissent présager des utilisations intéressantes dans le domaine thérapeutique (vectorisation PA) ;

- filtrabilité avec seuil de coupure inférieur ou égal à $0,2 \mu\text{m}$ à des fins de stérilisation ;
- biodégradabilité améliorée ;
- aptitude à l'injection optimisée.

5

Ces PAA peuvent être du type ordonné, séquentiel alterné (blocs) ou du type désordonné, séquentiel aléatoire (statistiques).

10 Ainsi, selon une première forme de réalisation des PV selon l'invention, les PAA constitutifs sont du type « bloc » et sont caractérisés par un rapport molaire $\text{AANO}/(\text{AANI} + \text{AANO})$ tel que :

- $\text{AANO}/(\text{AANI} + \text{AANO}) \geq 6\%$,
- $10\% \leq \text{AANO}/(\text{AANO} + \text{AANI}) \leq 70\%$,
- de préférence, $20\% \leq \text{AANO}/(\text{AANI} + \text{AANO}) \leq 60\%$,
- 15 • et plus préférentiellement encore, $35\% \leq \text{AANO}/(\text{AANI} + \text{AANO}) \leq 50\%$.

Avantageusement, la longueur absolue de chaque bloc d'AANO, exprimé en nombre d'AANO est telle que :

- $\text{AANO} \geq 5$,
- 20 • de préférence, $\text{AANO} \geq 10$,
- et, plus préférentiellement encore, $\text{AANO} \geq 20$.

Selon une deuxième forme de réalisation des PV selon l'invention, les PAA constitutifs sont du type « statistique » c'est-à-dire
25 préparés par copolymérisation simultanée de monomères de AANI et AANO, et le rapport molaire $\text{AANO}/(\text{AANO} + \text{AANI})$ est tel que :

- $\text{AANO}/(\text{AANO} + \text{AANI}) \geq 10\%$,
- et, de préférence, $\text{AANO}/(\text{AANO} + \text{AANI}) \geq 20\%$,
- et, plus préférentiellement encore, $30\% \leq \text{AANO}/(\text{AANI} + \text{AANO}) \leq 70\%$.

30

Avantageusement, la masse molaire M_w de ces PAA statistiques est telle que :

- $M_w \geq 2\,000 \text{ g/mol}$,
- 35 • de préférence, $M_w \geq 5\,500 \text{ g/mol}$,
- et plus, préférentiellement encore, $5\,500 \text{ g/mol} \leq M_w \leq 200\,000 \text{ g/mol}$.

Suivant une caractéristique préférée de l'invention, les PAA blocs ou statistiques constitutifs de particules ont des degrés de polymérisation DP compris entre 30 et 600, de préférence entre 50 et 200 et, plus préférentiellement encore, entre 60 et 150.

- 5 Avantageusement, les PAA constitutifs des particules PV sont des PAA « diblocs ».

De préférence, l'(les)AANI hydrophile(s) est(sont) choisi(s) dans le groupe comprenant :

- 10 ✓ les acides aminés neutres naturels, de préférence ceux choisis dans le groupe comprenant: sérine, thréonine, hydroxyproline, glutamine;
- ✓ les acides aminés neutres, rares ou synthétiques
- 15 suivants, de préférence ceux choisis dans le groupe comprenant : méthionine-S-oxyde, O-glycosidyl-sérine;
- ✓ les dérivés des acides aminés neutres, de préférence ceux choisis dans le groupe comprenant :
- N-hydroxyéthylglutamine, N-hydroxypropylasparagine, N-hydroxyéthyl-asparagine, N-hydroxypropylglutamine.

20

Avantageusement, l'(les)AANO hydrophobe(s) est(sont) choisi(s) dans le groupe comprenant :

- ♦ les acides aminés neutres naturels, de préférence ceux choisis dans le groupe comprenant : Leu, Ile, Val, Ala, Pro, Phe ;
- 25 ♦ les acides aminés neutres, rares ou synthétiques, de préférence ceux choisis dans le groupe comprenant : norleucine, norvaline ;
- ♦ les dérivés des acides aminés polaires, de préférence ceux choisis dans le groupe comprenant : glutamate de méthyle,
- 30 glutamate d'éthyle, aspartate de benzyle, N-acétyllysine.

- Suivant une caractéristique avantageuse, les particules de vectorisation (PV) de la suspension ont une de taille moyenne
- 35 comprise entre 0,01 et 0,5 μm , de préférence entre 0,01 et 0,2 μm .

La suspension a également pour caractéristique préférée d'être aqueuse et stable.

La présente invention vise, non seulement des suspensions de
5 particules nues, telles que définies ci-dessus, mais également des
particules comprenant au moins un principe actif PA. De
préférence, la suspension selon l'invention est aqueuse et stable.
Ces particules, chargées ou non en PA, sont, avantageusement, sous
forme dispersée dans un liquide (suspension), de préférence
10 aqueux, mais peuvent également être à l'état de solide
pulvérulent, obtenu à partir de la suspension de PV telle que
définie ci-dessus.

D'où il s'ensuit que l'invention concerne, outre une suspension
15 colloïdale (de préférence aqueuse) de PV, un solide pulvérulent
comprenant des PV et obtenu à partir de la suspension selon
l'invention.

Un autre objet essentiel de l'invention se rapporte à la
20 préparation :

- ✕ des particules sélectionnées telles que décrites ci-avant
- ✕ et d'autres particules sélectionnées qui sont structurées,
submicroniques et susceptibles d'être utilisées, notamment
pour la vectorisation de principe(s) actif(s) PA, ces
25 particules étant des arrangements supramoléculaires
individualisés (discrets) :
 - o à base de polyaminoacides (PAA) amphiphiles, linéaires, à
enchaînements peptidiques et comprenant au moins deux
types différents d'acides aminés récurrents hydrophiles AAI
30 et hydrophobes AAO, les acides aminés de chaque type étant
identiques ou différents entre eux ;
 - o aptes à associer en suspension colloïdale à l'état non
dissous, au moins un PA et à libérer celui-ci, notamment
in vivo, de manière prolongée et/ou retardée;
 - 35 o et stables en phase aqueuse à pH compris entre 4 et 13 en
l'absence de tensioactif(s);

dans laquelle :

- ✓ les aminoacides récurrents hydrophiles AAI sont au moins en partie constitués par de l'Asparagine;
- ✓ et les aminoacides récurrents hydrophobes AAO sont des aminoacides neutres hydrophobes AANO identiques ou différents entre eux;

ces particules pouvant être aussi bien sous forme de suspension colloïdale que sous forme de solide pulvérulent obtenu à partir d'une suspension colloïdale stable de particules.

- 10 Le procédé de préparation considéré consiste, essentiellement, à synthétiser des PAA précurseur et à les transformer en particules structurées.

Plus précisément, il s'agit, tout d'abord, d'un procédé de préparation de particules structurées submicroniques susceptibles d'être utilisées, notamment pour la vectorisation de principe(s) actif(s), ces particules étant des arrangements supramoléculaires discrets :

- o à base de polyaminoacides (PAA) amphiphiles, linéaires, à enchaînements peptidiques et comprenant au moins deux types différents d'aminoacides récurrents hydrophiles AAI et hydrophobes AAO, les aminoacides de chaque type étant identiques ou différents entre eux ;
- o aptes à associer en suspension colloïdale à l'état non dissous, au moins un PA et à libérer celui-ci, notamment in vivo, de manière prolongée et/ou retardée ;
- o et stables en phase aqueuse à pH compris entre 4 et 13 en l'absence de tensioactif(s).

Ce procédé est caractérisé en ce que :

- 30 1) on réalise une copolymérisation de monomères formés par des anhydrides de N-CarboxyAminoacides (NCA) d'au moins deux types différents :
- ♦ d'une part, des monomères NCA de départ comprenant des NCA-Glu-OR et/ou des NCA-Asp-OR, et/ou des NCA-AANI,
 - 35 ♦ et d'autre part, des NCA-AANO, en présence:
 - d'au moins un solvant polaire non aromatique, de préférence choisi dans le groupe comprenant: la

N-MéthylPyrrolidone (NMP), le DiMéthylFormamide (DMF), le DiMéthylsulfoxyde (DMSO), le DiMéthylAcétamide (DMAc), la pyrrolidone ; la NMP étant plus particulièrement préférées;

- 5 - et éventuellement d'au moins un co-solvant sélectionné parmi les solvants aprotiques (de préférence le dioxanne-1,4) et/ou les solvants protiques (de préférence la pyrrolidone) et/ou l'eau et/ou les alcools, le méthanol étant particulièrement préféré ;
- 10 2) dans le cas où les monomères NCA de départ sont des NCA-Glu-OR et/ou des NCA-Asp-OR (R= alkyle), on met en oeuvre une aminolyse qui consiste à mettre en présence le copolymère obtenu à l'étape 1 avec une phase aqueuse comprenant au moins une amine et qui permet la transformation de Glu-OR en Gln et
- 15 de Asp-OR en Asn ;
- 3) éventuellement on dialyse le milieu réactionnel pour purifier la suspension aqueuse de particules structurées ;
- 4) éventuellement on concentre cette suspension de l'étape 3;
- 5) on élimine le milieu liquide pour recueillir le solide
- 20 pulvérulent comprenant les particules.

La première étape du procédé s'inspire des techniques connues de polymérisation d'anhydrides de N-carboxy-(-aminoacides (NCA), décrites, par exemple, dans l'article «Biopolymers, 15, 1869

25 (1976)» et dans l'ouvrage de H.R. KRICHELDORF « α -Aminoacid-N-carboxy Anhydride and Related Heterocycles» Springer Verlag (1987).

La mise en œuvre de solvants de copolymérisation aprotiques non aromatiques polaire, judicieusement choisis, en évitant toute

30 précipitation et le fait d'avoir recours à une hydrolyse acide en présence d'eau et de solvant organique polaire non aromatique, permet d'obtenir des particules structurées, discrètes et submicroniques à forte capacité de chargement de PA, et qui forment une suspension colloïdale, stable en milieu aqueux. Ces

35 particules ne sont nullement comparables à un précipité aggloméré macroscopique du genre de celui évoqué ci-avant à propos de la proposition antérieure (d).

Suivant une variante, à l'issue de l'étape 1, on précipite - de préférence dans l'eau - le copolymère poly(AANO)(AANI) obtenu et on recueille ce précipité. Cette variante correspond à un mode discontinu de préparation de particules, dans lequel on isole le
5 copolymère poly(AANO)(AANI) sous forme de précipité formant un produit intermédiaire stable. Ce précipité peut être, par exemple, filtré, lavé et séché.

De manière plus préférée encore, les NCA-pAAI sont des NCA d'acide glutamique ou aspartique O-alkylé, par exemple des NCA-Glu-O-Me,
10 NCA-Glu-O-Et ou NCA-Glu-O-Bz (Me = méthyle - Et = Ethyle - Bz = Benzyle).

De manière connue, la copolymérisation se déroule à une température comprise entre 20 et 120°C, à pression atmosphérique et en présence d'un initiateur aminé, e.g. : NH₃.

15 D'autres paramètres expérimentaux, comme la concentration en NCA et/ou polymère dans le solvant polaire non aromatique (de préférence le NMP), et/ou la concentration ou la nature du cosolvant protique, lors de la synthèse, seront ajustés selon les effets désirés et connus de l'homme de l'art.

20 L'hydrolyse acide (étape 2) est réalisée à l'aide d'eau et d'au moins un acide minéral, tel l'aide phosphorique ou chlorhydrique - ce dernier étant préféré - et/ou un acide organique, tel l'acide TriFluoroAcétique (TFA), l'acide acétique, l'acide dichloroacétique, ou les acides organosulfoniques.

25 Les proportions eau/acide -exprimées en parties en poids- dans une phase aqueuse acide d'hydrolyse sont, avantageusement :

- de 60/1 à 2/1,
- de préférence 40/1 à 2/1,
- et, plus préférentiellement encore, 20/1 à 2/1.

30

Les proportions phase aqueuse acide d'hydrolyse/NMP - exprimées en parties en poids - sont, avantageusement :

- de 5/100 à 200/100
- de préférence, 10/100 à 100/100
- 35 • et, plus préférentiellement encore, de 20/100 à 80/100.

D'autres paramètres, comme la concentration en polymère, la température du mélange réactionnel, le mode d'ajout de la phase aqueuse acide d'hydrolyse, l'emploi de pression réduite, la durée de la réaction, etc..., sont ajustés selon les effets désirés et bien connus de l'homme de l'art.

La neutralisation (étape 3) s'opère, en pratique, par exemple à l'aide de soude.

On élimine ensuite le sel formé à l'issue de la neutralisation, ainsi que le solvant, par tout traitement de séparation physique approprié, par exemple par diafiltration (dialyse) (étape 4), filtration, modification pH, chromatographie...

Cela conduit à une suspension aqueuse de particules structurées qui peut être concentrée, par exemple par distillation ou tout autre moyen physique convenable : ultrafiltration, centrifugation.

Pour séparer, à l'étape 6, les particules de leur milieu liquide de suspension, on élimine, éventuellement, la phase aqueuse, par exemple par séchage (e.g. à l'étuve), par lyophilisation ou tout autre moyen physique convenable : ultrafiltration, centrifugation. On récupère, à l'issue de cette étape 6, un solide pulvérulent, de couleur blanche.

Selon une variante, l'étape de concentration peut être réalisée par un traitement chimique, tel qu'un abaissement du pH, qui transforme en acide la partie hydrophile des monomères glutamates, ce qui les rend insolubles dans l'eau. Ces intermédiaires PAA acides peuvent être filtrés, lavés et séchés. Lesdits intermédiaires acides peuvent être neutralisés avec une base chimique dans une étape ultérieure afin d'obtenir une suspension de particules.

Il est à noter que la mise en œuvre des étapes 1, 2, 3, 4 et éventuellement 5 du procédé ci-dessus correspondant à une préparation d'une suspension colloïdale de particules submicroniques et à fort taux de chargement avec les PA.

Lors de cette préparation de suspension colloïdale, les PAA amphiphiles poly(AANO)(AANI) de l'étape 2 sont placés dans un milieu aqueux dans lequel au moins une partie des AANI est soluble et au moins une partie des AANO est insoluble. Les PAA existent sous forme de nanoparticules dans ce milieu aqueux.

Une alternative pour préparer la suspension de PV selon l'invention consiste à mettre en présence le solide pulvérulent, tel que décrit ci-dessus et en tant que produit et par son procédé d'obtention, avec un milieu aqueux, non solvant des AANO.

5

Pour effectuer l'association d'un ou plusieurs PA aux particules, il est possible de mettre en œuvre plusieurs méthodes conformément à l'invention. Des exemples, non limitatifs de ces méthodes, sont énumérés ci-après.

10 Selon une première méthode, on effectue l'association de PA aux particules par mise en présence d'une phase liquide (aqueuse ou non) contenant le PA avec la suspension colloïdale de particules comprenant ou non de l'Asp à titre d'AANI.

15 Selon une deuxième méthode, on effectue l'association du PA aux particules par mise en présence d'un PA à l'état solide avec la suspension colloïdale de particules comprenant ou non de l'Asp à titre d'AANI. Le PA solide peut être, par exemple, sous forme de lyophilisat, de précipité, de poudre ou autre.

20 Selon une troisième méthode, on met en présence le solide pulvérulent (PAA comprenant ou non de l'Asp à titre d'AANI), tel que décrit supra en tant que produit et par ses caractéristiques d'obtention, avec une phase liquide (aqueuse ou non) contenant le PA.

25 Selon une quatrième méthode, on met en présence le solide pulvérulent, tel que décrit supra en tant que produit et par ses caractéristiques d'obtention (PAA comprenant ou non de l'Asp à titre d'AANI), avec le PA sous forme solide. On disperse ensuite ce mélange de solides, dans une phase liquide, de préférence une solution aqueuse.

30 Dans toutes ces méthodes, le PA utilisé peut être sous forme pure ou préformulée.

35 Compte tenu de la taille nanométrique des particules, la suspension peut être filtrée sur des filtres de stérilisation, ce qui permet d'obtenir, aisément et à moindre coût, des liquides médicamenteux injectables stériles. Le fait de pouvoir, grâce à

l'invention, contrôler la taille des particules et atteindre des valeurs de Dh entre 25 et 100 nm, est un atout important.

La présente invention vise, également, de nouveaux produits
5 intermédiaires du procédé décrit ci-dessus, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des copolymères PAA (comprenant ou non de l'Asp à titre d'AANI) précurseurs de particules.

APPLICATION INDUSTRIELLE

10 Selon un autre de ses aspects, l'invention concerne une suspension et/ou un solide pulvérulent (PAA comprenant ou non de l'Asp à titre d'AANI), tels que définis ci-dessus et/ou tels qu'obtenus par le procédé présenté supra, cette suspension et ce solide comprenant au moins un principe actif, choisi, de préférence, parmi :

- 15 • les vaccins ;
- les protéines et/ou les peptides, parmi lesquels les plus préférentiellement retenus sont : les hémoglobines, les cytochromes, les albumines, les interférons, les antigènes, les anticorps, l'érythropoïétine, l'insuline,
- 20 les hormones de croissance, les facteurs VIII et IX, les interleukines ou leurs mélanges, les facteurs stimulants de l'hématopoïèse ;
- les polysaccharides, l'héparine étant plus particulièrement sélectionnée ;
- 25 • les acides nucléiques et, préférentiellement, les oligonucléotides d'ARN et/ou d'ADN ;
- des molécules non peptido-protéiques appartenant à diverses classes de chimiothérapie anticancéreuses et, en particulier, les anthracyclines et les taxoïdes ;
- 30 • et leurs mélanges.

L'invention vise, également, une suspension et/ou le solide pulvérulent (PAA comprenant ou non de l'Asp à titre d'AANI) chargé(s) en PA nutritionnel, phytosanitaire ou cosmétique.

Enfin, l'invention concerne une spécialité pharmaceutique, nutritionnelle, phytosanitaire ou cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comporte une suspension et/ou du solide pulvérulent chargé(s) en PA et tels que définis ci-dessus.

5 Selon un autre de ses objets, l'invention vise, également, l'utilisation de ces PV (en suspension ou sous forme solide:PAA comprenant ou non de l'Asp à titre d'AANI) chargées en PA, pour la fabrication de médicaments du type systèmes à libération contrôlée de PA.

10 En particulier, l'invention se rapporte à l'utilisation d'une suspension colloïdale stable de particules structurées submicroniques chargées en principe(s) actif(s) PA, ces particules étant des arrangements supramoléculaires individualisés (discrets) :

15 o à base de polyaminoacides (PAA) amphiphiles, linéaires, à enchaînements peptidiques et comprenant au moins deux types différents d'acides aminés récurrents hydrophiles AAI et hydrophobes AAO, les acides aminés de chaque type étant identiques ou différents entre eux ;

20 o aptes à associer en suspension colloïdale à l'état non dissous, au moins un PA et à libérer celui-ci, notamment in vivo, de manière prolongée et/ou retardée;
o et stables en phase aqueuse à pH compris entre 4 et 13 en l'absence de tensioactif(s);

25 dans laquelle:

✓ les acides aminés récurrents hydrophiles AAI sont au moins en partie constitués par de l'Asparagine;
✓ et les acides aminés récurrents hydrophobes AAO sont des acides aminés neutres hydrophobes AANO identiques ou
30 différents entre eux;

pour la préparation d'une suspension aqueuse ou d'un solide pulvérulent, chargé en au moins PA et tel que défini dans les revendications précédentes.

Dans le cas de médicaments, il peut s'agir, par exemple de ceux administrables, de préférence par voie orale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou parentérale.

- 5 Les applications cosmétiques envisageables sont, par exemple, les compositions comprenant un PA associé aux PV selon l'invention et applicables par voie transdermique.

Les produits phytosanitaires concernés peuvent être, par exemple, des herbicides, des pesticides, des insecticides, des fongicides,
10 etc...

Les exemples qui suivent permettront de mieux comprendre l'invention dans ses différents aspects produit/procédé/application. Ces exemples illustrent la préparation de particules de polyaminoacides chargés ou non en
15 principes actifs, de même qu'ils présentent les caractéristiques de structure et les propriétés de ces particules.

20 **EXEMPLES**

Exemple 1 - Préparation du polymère - poly(leucine)-bloc-(glutamate de méthyle)

- 25 Les techniques utilisées, pour la polymérisation des NCA en polymères de structures en blocs ou statistiques sont connues de l'homme de l'art et sont détaillées dans l'ouvrage de H. R. KRICHELDORF "α-Aminoacides-N-Carboxy Anhydrides and Related Heterocycles", Springer Verlag (1987). La synthèse suivante
30 précise la synthèse de l'un d'entre eux.

Synthèse de la poly(Leu)₄₀-poly(GluOMe)₈₀: 10 g de NCA-GluOMe sont solubilisés dans un mélange de 150 ml de NMP à 60°C. 5 ml d'une solution de 0,91 g de benzylamine dans 50 ml de NMP sont ajoutés
35 au monomère en une fois. Après 1 h, on ajoute 14,1 g de NCA-Leu solubilisé préalablement dans 20 ml de NMP. La polymérisation continue encore durant 3-4 h.

Un prélèvement du milieu réactionnel permet de connaître les caractérisations suivantes : Rendement 90 %. Composition par RMN 1H: (TFA-d) 66 % molaire GluOMe. Viscosité réduite (0,5% de TFA à 25°C) 0,4 dl/g. Masse Molaire par GPC : 20 000 g/mol.

5

Exemple 2 - Aminolyse du poly(leucine)-bloc-(glutamate de méthyle) avec l'hydroxyéthylamine

A la solution de polymère dans la NMP préparé selon l'exemple 1, sont ajouté 10 g d'hydroxyéthylamine en une fois. Le milieu est porté et maintenu à 80°C pendant 2 jours. On ajoute ensuite 150 ml d'eau à la solution du polymère. Elle est ensuite purifiée par une étape de dialyse qui assure l'élimination de l'excès d'amine et la NMP. Les particules sont enfin isolées par lyophilisation.

Rendement quantitatif. RMN 1H (TFA-d) : 8% Methoxy résiduels (3.5ppm); 92% hydroxyéthylglutamine. Composition RMN 1H (TFA-d) : 34% Leu. Taille des particules (diffusion de la lumière mode QLS) : 100nm.

Exemple 3 - Mise en évidence des nanoparticules par Diffusion de la Lumière (DDL) et par Microscopie Electronique à Transmission (TEM)

10 mg de particules du polymère 1 sont suspendus dans 10 ml d'eau ou une solution aqueuse de sel. Cette solution est ensuite introduite dans un granulomètre Coulter (ou diffractomètre laser). Les résultats de l'analyse de la granulométrie des différents produits testés sont présentés dans le tableau 1 suivant.

30

Tableau 1 - Mesures de la taille des PV

Exemple	Polymère	Taille (nm)
2	POLY[(LEU) _{0,66} -BLOC-(GLN-N-HYDROXYETHYL) _{0,37}] _x	100

Exemple 4 : Test d'association des nanoparticules avec une protéine (l'insuline)

A partir d'une solution tampon phosphate isotonique de pH 7,4, on
 5 prépare une solution d'insuline humaine titrée à 1,4 mg/ml
 correspondant à 40 UI/ml. Dans 1 ml de cette solution d'insuline,
 on disperse 10 mg du PV préparé dans l'exemple 1. Après 15 heures
 d'incubation à température ambiante, l'insuline associée aux PV et
 l'insuline libre sont séparées par centrifugation (60 000 g,
 10 1heure) et ultrafiltration (seuil de filtration 300 000 D).
 L'insuline libre récupérée dans le filtrat est dosée par CLHP ou
 par ELISA et l'on en déduit par différence la quantité d'insuline
 associée. La quantité d'insuline associée au PV est supérieure à
 0,77 mg, ce qui représente plus de 55% du total de l'insuline
 15 engagée.

Le tableau suivant rassemble les résultats des mesures de taux
 d'association effectuées sur différents PV. Le taux d'association
 exprime le pourcentage d'insuline associée par rapport à
 l'insuline engagée dans une préparation titrée à 1.4 mg/ml
 20 d'insuline et 10 mg/ml de PV. Cette valeur est transformée en un
 taux de chargement qui exprime une formulation à 100% de fixation
 de la protéine, en mg d'insuline par 100 mg de PV.

25 **Tableau 2 - Mesures du taux d'association avec l'insuline
 pour un mélange 0.14 mg INSULINE/mg PV**

Exemple	Polymère	Taux d'associatio n (%)	Taux de chargement mg/100mg PV
2	POLY[(LEU) 0.66-BLOC-(GLN-N-HYDROXYETHYL) 0,37] _x	99	13.6

Exemple 5 : Pharmacocinétique et pharmacodynamie des PV-charges avec l'insuline chez le chien sain à jeun

La préparation particules+insuline de l'exemple 4. a été injectée à des chiens, rendus diabétiques par pancréatectomie totale et à jeun de la veille au soir. L'administration à 11 heures du matin par voie sous cutanée thoracique de la préparation a été faite à la posologie de 0,5 UI/kg d'insuline par Kg de poids vif de l'animal. Le volume administré est compris entre 0,18 et 0,24 ml. Au temps -4, -2, 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 et 48 heures, 1 ml de sang sont prélevés par ponction jugulaire sous vide sur tube héparinate de sodium. 30 μ l de sang total sont utilisés extemporanément pour mesure de la glycémie. Le tube est ensuite centrifugé, décanté et le plasma stocké à -20° C pour dosage de l'insuline. Les résultats présentés dans la figure 1 ci-après montrent un relarguage de l'insuline jusqu'à 12 heures (trait plein) et un effet hypoglycémiant important qui se prolonge jusqu'à 20 heures (trait discontinu) après l'injection.

Tableau 3 - Mesures du temps d'action de l'insuline (effet hypoglycémiant) en présence de PV selon l'invention

Exemple	Polymère	Temps de retour au niveau basal (h)
	INSULINE SOLUBLE (SANS PV)	1
2	POLY[(LEU)0.66-BLOC-(GLN-N-HYDROXYETHYL)0,37] _x	20H

Cet exemple démontre la non dénaturation de l'insuline en présence de PV selon l'invention.

De plus, l'exemple 2 permet de mettre en évidence l'augmentation de la durée d'action de l'insuline par rapport à l'insuline non formulée, et donc, l'utilité des PV en tant que système retard pour la libération contrôlée de l'insuline. Elle montre également comment il est possible de maîtriser la durée d'action par la choix judicieuse du groupement hydrophobe.

Exemple 6: Aminolyse du poly(Phénylalanine)-bloc-(glutamate de méthyle) avec l'hydroxyéthylamine

A la solution de polymère dans la NMP préparé selon l'exemple 1 en
5 partant des monomères NCAGluOME et NCAPhénylalanine, sont ajoutés
10 g d'hydroxyéthylamine en une fois. Le milieu est porté et
maintenu à 80°C pendant 2 jours. On ajoute ensuite 150ml d'eau à
la solution du polymère. Elle est ensuite purifiée par une étape de
dialyse qui assure l'élimination de l'excès d'amine et la NMP. Les
10 particules sont enfin isolées par lyophilisation.
Rendement quantitatif. RMN ¹H (TFA-d) : 6% Methoxy résiduels
(3.5ppm); 94% hydroxyéthylglutamine. Composition RMN ¹H (TFA-d):
34% Leu. Taille des particules (diffusion de la lumière mode QLS):
100 nm.

15

Exemple 7: Aminolyse du poly(leucine-bloc-glutamate de benzyle) avec la 3-amino-propylène-1,2-glycol

20 A la solution de polymère dans la NMP préparée selon l'exemple 1,
en partant des monomères NCAGluOBzl et NCALeu, sont ajoutés 10g de
3-amino-propylène-1,2-glycol en une fois. Le milieu est porté à
80°C pendant 2 jours. On ajoute ensuite 150 ml d'eau à la solution
du polymère. Elle est ensuite purifiée par une étape de dialyse
25 qui assure l'élimination de l'excès d'amine et du solvant. Les
particules sont enfin isolées par lyophilisation. Rendement
quantitatif. Taille des particules (QLS, selon l'exemple 3) :
100 nm.

30

Exemple 8: Test d'association des nanoparticules avec une protéine (l'insuline)

Selon l'exemple 4, on met en oeuvre les particules isolées de
35 l'exemple 6 et de l'insuline humaine pour obtenir un taux de
chargement exprimé en mg d'insuline par 100mg de PV.

Exemples	Polymère	Taux d'association	Taux de chargement en mg/100mg PV
6	POLY (PHE _{0.79} -BLOC-GLN-N- DIHYDROXYPROPYL _{0.21}) _x	99	8.5
7	POLY (LEU _{0.66} -BLOC-GLN-N- DIHYDROXYPROPYL _{0.33}) _x	99	13.7

REVENDICATIONS

1 - Suspension colloïdale stable de particules structurées submicroniques susceptibles d'être utilisées, notamment pour la
5 vectorisation de principe(s) actif(s) PA, ces particules étant des arrangements supramoléculaires individualisés (discrets) :

- o à base de polyaminoacides (PAA) amphiphiles, linéaires, à enchaînements peptidiques et comprenant au moins deux types différents d'acides aminés récurrents hydrophiles AAI et hydrophobes AAO, les acides aminés de chaque type étant
10 identiques ou différents entre eux ;
- o aptes à associer en suspension colloïdale à l'état non dissous, au moins un PA et à libérer celui-ci, notamment in vivo, de manière prolongée et/ou retardée;
- 15 o et stables en phase aqueuse à pH compris entre 4 et 13 en l'absence de tensioactif(s);

caractérisée :

- ✓ en ce que les acides aminés récurrents hydrophiles AAI sont des acides aminés neutres hydrophiles AANI à l'exclusion de l'Asparagine;
20
- ✓ en ce que les acides aminés récurrents hydrophobes AAO sont des acides aminés neutres hydrophobes AANO ;
- ✓ et en ce que les acides aminés récurrents de chaque type AANI et AANO étant identiques ou différents entre eux.
25

2 - Suspension selon la revendication 1, caractérisée en ce que les PAA constitutifs des particules sont des PAA "blocs", dans
30 lesquels:

- o le rapport molaire AANO/(AANI + AANO) est $\geq 6\%$,
- o et la longueur absolue du bloc AANO est ≥ 5 , de préférence ≥ 10 , et plus préférentiellement ≥ 20 .

3 - Suspension selon la revendication 1, caractérisée en ce que les PAA constitutifs des particules sont des PAA "copolymères statistiques" caractérisés en ce que:

- 5 • le rapport molaire AANI/(AANI + AANO) est $\geq 10\%$, et de préférence $\geq 20\%$ et plus préférentiellement entre 30 et 70%,
- la masse molaire $M_w \geq 2000$ Da.

10 4 - Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'(les)AANI hydrophile(s) est(sont) choisi(s) dans le groupe comprenant :

- ✓ les acides aminés neutres naturels, de préférence ceux choisis dans le groupe comprenant: sérine, thréonine, hydroxyproline, glutamine;
- 15 ✓ les acides aminés neutres, rares ou synthétiques suivants, de préférence ceux choisis dans le groupe comprenant : méthionine-S-oxyde, O-glycosidyl-sérine;
- 20 ✓ les dérivés des acides aminés neutres, de préférence ceux choisis dans le groupe comprenant : N-hydroxyéthylglutamine, N-hydroxypropylasparagine, N-hydroxyéthyl-asparagine, N-hydroxypropylglutamine.

25 5 - Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'(les)AANO hydrophobe(s) est(sont) choisi(s) dans le groupe comprenant :

- ♦ les acides aminés neutres naturels, de préférence ceux choisis dans le groupe comprenant : Leu, Ile, Val, Ala, Pro, Phe ;
- ♦ les acides aminés neutres, rares ou synthétiques, de préférence ceux choisis dans le groupe comprenant : norleucine, norvaline ;
- 30 ♦ les dérivés des acides aminés polaires, de préférence ceux choisis dans le groupe comprenant : glutamate de méthyle, glutamate d'éthyle, aspartate de benzyle, N-acétyllysine.

- 6 - Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que les particules de vectorisation (PV) qu'elle contient ont une de taille moyenne comprise entre 0,01 et 0,5 μm , de préférence entre 0,01 et 0,2 μm .
- 5 7 - Suspension colloïdale aqueuse de particules, selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle est aqueuse et stable.
- 10 8 - Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que les particules comprennent au moins un principe actif.
- 15 9 - Solide pulvérulent caractérisé en ce qu'il est obtenu à partir de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.
- 10 - Procédé de préparation du solide pulvérulent selon la revendication 9 ou du solide pulvérulent obtenu à partir d'une suspension colloïdale stable de particules structurées submicroniques susceptibles d'être utilisées, notamment pour la vectorisation de principe(s) actif(s) PA, ces particules étant des arrangements supramoléculaires individualisés (discrets) :
- 20 o à base de polyaminoacides (PAA) amphiphiles, linéaires, à enchaînements peptidiques et comprenant au moins deux types différents d'acides aminés récurrents hydrophiles AAI et hydrophobes AAO, les acides aminés de chaque type étant identiques ou différents entre eux ;
- 25 o aptes à associer en suspension colloïdale à l'état non dissous, au moins un PA et à libérer celui-ci, notamment in vivo, de manière prolongée et/ou retardée ;
- 30 o et stables en phase aqueuse à pH compris entre 4 et 13 en l'absence de tensioactif(s);
- dans laquelle:
- 35 ✓ les acides aminés récurrents hydrophiles AAI sont au moins en partie constitués par de l'Asparagine,

✓ et les aminoacides récurrents hydrophobes AAO sont des aminoacides neutres hydrophobes AANO identiques ou différents entre eux,

5 caractérisé en ce que :

1) on réalise une copolymérisation de monomères formés par des anhydrides de N-CarboxyAminoacides (NCA) d'au moins deux types différents,

10 ♦ d'une part, des monomères NCA de départ comprenant des NCA-Glu-OR et/ou des NCA-Asp-OR, et/ou des NCA-AANI,

♦ et d'autre part, des NCA-AANO, en présence:

15 - d'au moins un solvant polaire non aromatique, de préférence choisi dans le groupe comprenant: la N-MéthylPyrrolidone (NMP), le DiMéthylFormamide (DMF), le DiMéthylsulfoxyde (DMSO), le DiMéthylAcétamide (DMAC), la pyrrolidone ; la NMP étant plus particulièrement préférées ;

20 - et éventuellement d'au moins un co-solvant sélectionné parmi les solvants aprotiques (de préférence le dioxanne-1,4) et/ou les solvants protiques (de préférence la pyrrolidone) et/ou l'eau et/ou les alcools, le méthanol étant particulièrement préféré ;

25 2) dans le cas où les monomères NCA de départ sont des NCA-Glu-OR et/ou des NCA-Asp-OR (R = alkyle), on met en oeuvre une aminolyse qui consiste à mettre en présence le copolymère obtenu à l'étape 1 avec une phase aqueuse comprenant au moins une amine et qui permet la transformation de Glu-OR en Gln et de Asp-OR en Asn ;

30 3) éventuellement on dialyse le milieu réactionnel pour purifier la suspension aqueuse de particules structurées ;

4) éventuellement on concentre cette suspension de l'étape 3 ;

5) on élimine le milieu liquide pour recueillir le solide pulvérulent comprenant les particules.

11 - Procédé de préparation de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'on met en présence d'un milieu aqueux, le solide pulvérulent selon la revendication 9 et/ou le solide pulvérulent obtenu par le
5 procédé selon la revendication 10.

12 - Procédé de préparation de la suspension selon la revendication 9, ou d'une suspension colloïdale stable de particules structurées submicroniques chargées en principe(s)
10 actif(s) PA, ces particules étant des arrangements supramoléculaires individualisés (discrets) :

- o à base de polyaminoacides (PAA) amphiphiles, linéaires, à enchaînements peptidiques et comprenant au moins deux types différents d'acides aminés récurrents hydrophiles AAI et hydrophobes AAO, les acides aminés de chaque type étant
15 identiques ou différents entre eux ;
- o aptes à associer en suspension colloïdale à l'état non dissous, au moins un PA et à libérer celui-ci, notamment in vivo, de manière prolongée et/ou retardée ;
- 20 o et stables en phase aqueuse à pH compris entre 4 et 13 en l'absence de tensioactif(s) ;

dans laquelle:

- ✓ les acides aminés récurrents hydrophiles AAI sont au moins en partie constitués par de l'Asparagine,
- 25 ✓ et les acides aminés récurrents hydrophobes AAO sont des acides aminés neutres hydrophobes AANO identiques ou différents entre eux,

caractérisé en ce que l'on effectue l'association du PA aux particules, par mise en présence d'une phase liquide contenant le
30 PA avec la suspension colloïdale de particules et/ou le solide pulvérulent obtenu par le procédé selon la revendication 11.

13 - Procédé de préparation de la suspension selon la revendication 9 ou d'une suspension colloïdale stable de
35 particules structurées submicroniques chargées en principe(s) actif(s) PA, ces particules étant des arrangements supramoléculaires individualisés (discrets) :

- o à base de polyaminoacides (PAA) amphiphiles, linéaires, à enchaînements peptidiques et comprenant au moins deux types différents d'acides aminés récurrents hydrophiles AAI et hydrophobes AAO, les acides aminés de chaque type étant identiques ou différents entre eux ;
- o aptes à associer en suspension colloïdale à l'état non dissous, au moins un PA et à libérer celui-ci, notamment in vivo, de manière prolongée et/ou retardée ;
- o et stables en phase aqueuse à pH compris entre 4 et 13 en l'absence de tensioactif(s) ;

dans laquelle:

- ✓ les acides aminés récurrents hydrophiles AAI sont au moins en partie constitués par de l'Asparagine,
- ✓ et les acides aminés récurrents hydrophobes AAO sont des acides aminés neutres hydrophobes AANO identiques ou différents entre eux,

caractérisé en ce que l'on effectue l'association du PA aux particules par mise en présence d'un PA à l'état solide avec la suspension colloïdale de particules.

20

- 14 - Procédé de préparation de la suspension selon la revendication 9, ou d'une suspension colloïdale stable de particules structurées submicroniques chargées en principe(s) actif(s) PA, ces particules étant des arrangements supramoléculaires individualisés (discrets) :

- o à base de polyaminoacides (PAA) amphiphiles, linéaires, à enchaînements peptidiques et comprenant au moins deux types différents d'acides aminés récurrents hydrophiles AAI et hydrophobes AAO, les acides aminés de chaque type étant identiques ou différents entre eux ;
- o aptes à associer en suspension colloïdale à l'état non dissous, au moins un PA et à libérer celui-ci, notamment in vivo, de manière prolongée et/ou retardée ;
- o et stables en phase aqueuse à pH compris entre 4 et 13 en l'absence de tensioactif(s) ;

dans laquelle:

- ✓ les aminoacides récurrents hydrophiles AAI sont au moins en partie constitués par de l'Asparagine,
 - ✓ et les aminoacides récurrents hydrophobes AAO sont des aminoacides neutres hydrophobes AANO identiques ou différents entre eux,
- 5 caractérisé en ce que l'on met en présence le solide pulvérulent selon la revendication 9 et/ou le solide pulvérulent obtenu par le procédé selon la revendication 10, avec une phase liquide
- 10 contenant le PA.

15 - Procédé de préparation de la suspension selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'on met en présence le solide pulvérulent selon la revendication 10 et/ou le solide pulvérulent obtenu par le procédé selon la revendication 11, avec le PA sous forme solide et en ce que l'on disperse ce mélange de solides dans une phase liquide, de préférence une solution aqueuse.

20 16 - Produits intermédiaires du procédé selon la revendication 10, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des copolymères PAA précurseurs de particules.

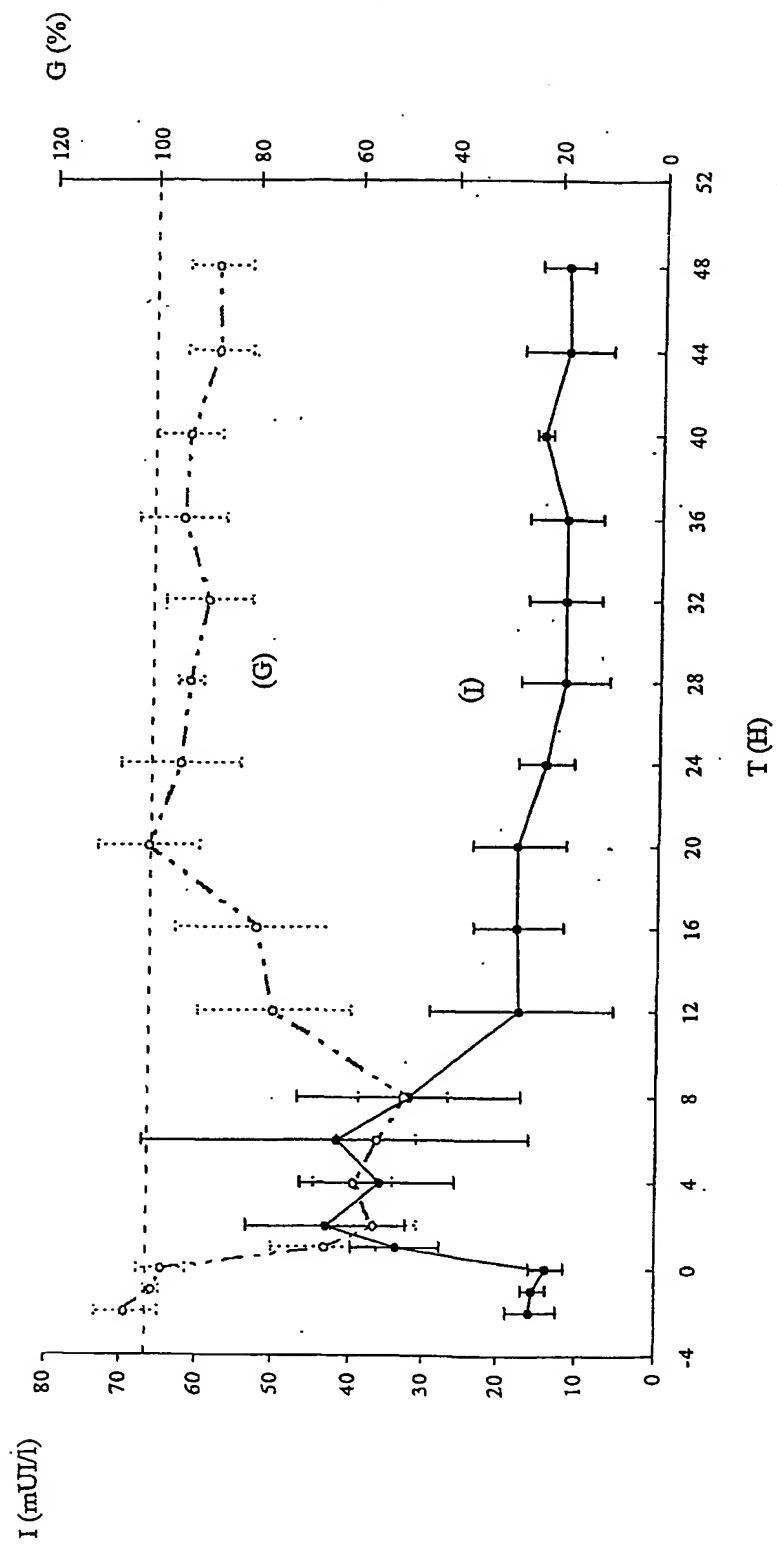
25 17 - Suspension selon la revendication 9 et/ou obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 12 à 15 et/ou solide pulvérulent selon la revendication 10 obtenu par le procédé selon la revendication 11, comprenant un moins un principe actif choisi, de préférence, parmi:

- les vaccins ;
 - les protéines et/ou les peptides, parmi lesquels les plus préférentiellement retenus sont : les hémoglobines, les cytochromes, les albumines, les interférons, les antigènes, les anticorps, l'érythropoïétine, l'insuline, les hormones de croissance, les facteurs VIII et IX, les interleukines ou leurs mélanges, les facteurs stimulants de l'hématopoïèse ;
- 30
- 35

- les polysaccharides, l'héparine étant plus particulièrement sélectionnée ;
 - les acides nucléiques et, préférablement, les oligonucléotides d'ARN et/ou d'ADN ;
- 5 • des molécules non peptido-protéiques appartenant à diverses classes de chimiothérapie anti-cancéreuses et, en particulier, les anthracyclines et les taxoïdes, et leurs mélanges.
- 10 18 - Suspension selon la revendication 7 et/ou suspension obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 12 à 15, et/ou solide pulvérulent selon la revendication 10 ou obtenu par le procédé selon la revendication 11, comprenant au moins un principe actif nutritionnel, phytosanitaire ou
- 15 cosmétique.
- 19 - Spécialité pharmaceutique, nutritionnelle, phytosanitaire ou cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comporte une suspension et/ou du solide pulvérulent selon la revendication 17 ou 18.
- 20 20 - Utilisation d'une suspension colloïdale stable de particules structurées submicroniques chargées en principe(s) actif(s) PA, ces particules étant des arrangements supramoléculaires individualisés (discrets) :
- 25 o à base de polyaminoacides (PAA) amphiphiles, linéaires, à enchaînements peptidiques et comprenant au moins deux types différents d'acides aminés récurrents hydrophiles AAI et hydrophobes AAO, les acides aminés de chaque type étant identiques ou différents entre eux ;
- 30 o aptes à associer en suspension colloïdale à l'état non dissous, au moins un PA et à libérer celui-ci, notamment in vivo, de manière prolongée et/ou retardée ;
- o et stables en phase aqueuse à pH compris entre 4 et 13 en l'absence de tensioactif(s) ;
- 35 dans laquelle:
- ✓ les acides aminés récurrents hydrophiles AAI sont au moins en partie constitués par de l'Asparagine,

✓ et les aminoacides récurrents hydrophobes AAO sont des aminoacides neutres hydrophobes AANO identiques ou différents entre eux ;
pour la préparation d'une suspension aqueuse ou d'un solide
5 pulvérulent, chargé en au moins PA et tel que défini dans les revendications précédentes.

1/1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 01/03083

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 B01J13/00 A61K9/51

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	FR 2 801 226 A (FLAMEL TECH SA) 25 May 2001 (2001-05-25) page 7, line 15 -page 9, line 24 page 10, line 30 -page 11, line 27 page 12, line 25 -page 13, line 15 page 15, line 23 -page 16, line 34 page 18; examples 1,2 claims 1-18	1-9, 11-20
X	FR 2 746 035 A (FLAMEL TECH SA) 19 September 1997 (1997-09-19) page 15, line 1 -page 16, line 7 page 30 -page 31; example 5 claims 1-19	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 November 2001

Date of mailing of the international search report

29/11/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Muller, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/03083

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2801226	A	25-05-2001	FR 2801226 A1	25-05-2001
			AU 7798600 A	04-06-2001
			WO 0137809 A1	31-05-2001
FR 2746035	A	19-09-1997	FR 2746035 A1	19-09-1997
			AT 206912 T	15-11-2001
			AU 2166097 A	10-10-1997
			CA 2249274 A1	25-09-1997
			EP 0888110 A1	07-01-1999
			WO 9734584 A1	25-09-1997
			JP 2000507934 T	27-06-2000
			US 6180141 B1	30-01-2001

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De: e Internationale No

PCT/FR 01/03083

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 B01J13/00 A61K9/51

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K B01J

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
E	FR 2 801 226 A (FLAMEL TECH SA) 25 mai 2001 (2001-05-25) page 7, ligne 15 -page 9, ligne 24 page 10, ligne 30 -page 11, ligne 27 page 12, ligne 25 -page 13, ligne 15 page 15, ligne 23 -page 16, ligne 34 page 18; exemples 1,2 revendications 1-18	1-9, 11-20
X	FR 2 746 035 A (FLAMEL TECH SA) 19 septembre 1997 (1997-09-19) page 15, ligne 1 -page 16, ligne 7 page 30 -page 31; exemple 5 revendications 1-19	1-20

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

& document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 novembre 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

29/11/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Muller, S

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De e Internationale No
PCT/FR 01/03083

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2801226 A	25-05-2001	FR 2801226 A1	25-05-2001
		AU 7798600 A	04-06-2001
		WO 0137809 A1	31-05-2001
FR 2746035 A	19-09-1997	FR 2746035 A1	19-09-1997
		AT 206912 T	15-11-2001
		AU 2166097 A	10-10-1997
		CA 2249274 A1	25-09-1997
		EP 0888110 A1	07-01-1999
		WO 9734584 A1	25-09-1997
		JP 2000507934 T	27-06-2000
		US 6180141 B1	30-01-2001